

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790419

研究課題名(和文) γ-グルタミルトランスペプチダーゼのサルモネラ病原性への影響の解析

研究課題名(英文) Investigation of the functions of gamma-glutamyltranspeptidase in Salmonella

研究代表者

中野 政之(Nakano, Masayuki)

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：60398005

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：サルモネラが保持する γ-グルタミルトランスペプチダーゼ(GGT)について本菌の病原性における役割を検討したところ、本研究ではGGTがサルモネラの病原性に関与する結果を得ることが出来なかった。また、サルモネラのGGT活性は低温環境下にて上昇することが明らかとなった。また、解析よりRNA chaperoneであるHfqがGGTの活性に深く関与することがわかった。この結果より、GGTの発現にはsmall RNAが関与することが示唆され、現在はこの点について解析を行っている。

研究成果の概要(英文)：To understand the role of gamma-glutamyltranspeptidase (GGT) in Salmonella, I investigated whether GGT is contributed to the Salmonella virulence. Although I analyzed the functions of GGT using the ggt gene-disrupted mutant, I could not find the association with GGT and Salmonella virulence. Salmonella was cultured at 20 C, GGT activity was elevated than that at 37 C. When I investigated the molecular mechanisms on GGT activity, I found that GGT activity in the hfq gene-disrupted mutant (hfq-mutant) was decreased compared with that of wild-type Salmonella. In addition, GGT activity in the hfq gene-complemented hfq-mutant was elevated compared with that of hfq-mutant. These results suggested that the RNA chaperone Hfq is involved in the GGT activity. Therefore, I speculated that production of GGT in Salmonella is the low temperature dependent manner and a novel non-coding small RNA in Salmonella should be associated with the exhibition of GGT activity.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学

キーワード：サルモネラ γ-グルタミルトランスペプチダーゼ

1. 研究開始当初の背景

サルモネラは本邦のみならず、世界中でも主要な細菌性食中毒の原因菌として広く知られた存在であり、その対策が常に求められている。

γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT) はグルタチオンとグルタミンの代謝 (= 分解) に必要な酵素であり、ヒトや動物のみならず、興味深いことに病原細菌にも存在する。特に、胃ガンなどの形成に関与するピロリ菌では GGT が病態形成に関与することが示唆されている。これまでに、サルモネラにも *ggt* 遺伝子が保持されているが、サルモネラの病原性と GGT との関わりについては不明であった。

2. 研究の目的

先に述べたように、胃ガンなどの発症に関与するピロリ菌の病原性と GGT の関連性が示唆されている。しかし、サルモネラにおいては GGT の存在は明らかとなっているが、その役割 (特に病原性と関わり) については十分な検証が行われていない。

そこで、本研究ではサルモネラの病原性と GGT の関連性を明らかにすることを目的とし、特に *in vitro* での解析を中心に行うことでその評価を行った。また、同時にサルモネラにおける GGT 発現に関わる分子メカニズムの解析についても行った。

3. 研究の方法

(1) サルモネラ病原性と GGT との関連性

サルモネラには全ゲノム配列の解析により *ggt* 遺伝子が存在することが知られているが、その機能や役割については十分な解析が行われていない。そこで、*ggt* 遺伝子を相同組換え法により破壊した遺伝子欠損株 (Δggt) を作製し、野生型サルモネラとの性状を比較することにより GGT の役割を明らかにする。その評価法として、酸性条件下や

過酸化水素存在下での菌の増殖性を調べる耐性試験、バイオフィーム形成、さらには株化培養細胞 (マクロファージ系や上皮細胞系) を用いた解析などにより行った。

なお、本研究では指標菌としてサルモネラ食中毒の原因菌として最も高頻度に分離される血清型である *Salmonella enterica* serovar Typhimurium と *S. enterica* serovar Enteritidis の 2 つの血清型を使用した。

(2) GGT 発現機構の解析

これまでに、大腸菌では低温条件下 (20 °C) で培養することにより GGT 活性が 37 °C での培養条件時よりも上昇することが報告されているが、その分子メカニズムについては不明である。そこで、本研究では温度感受性の遺伝子発現制御に関与する因子 (Hfq や Hns など) の遺伝子欠損株を相同組換え法により作製し、サルモネラの GGT 発現に関与する因子の同定を行い、加えて GGT 発現における分子メカニズムの解明を試みた。

4. 研究成果

(1) サルモネラ病原性における GGT の役割に関する解析

はじめに相同組換え法により Δggt の作製を試み、その作製に成功した。次に、作製した Δggt を用いて野生型サルモネラとの性状の違いについて検討を行った。検討を行った項目として、酸性環境下におけるサルモネラの生存率や増殖性を確認する耐酸性試験、過酸化水素に対する耐性試験、バイオフィーム形成能などを調べたが、いずれの項目においても野生型と Δggt との相違を見つけることは出来なかった。さらに、サルモネラの病原性の指標として広く知られている上皮由来株化培養細胞に対する侵入性とマクロファージ系株化培養細胞内での生存試験について検討を行ったが、いずれも野生型と Δggt ではその性状の違いを認めることは出来な

かった。これらの結果より、in vitro での解析においてサルモネラ病原性と GGT に関連性を認めることが出来なかった。しかし、この時点で GGT がサルモネラの病原性との関連性を断定することは早計であり、今後はマウスを用いた動物実験を行うことで最終的な判断をする予定である。

(2)GGT 活性の測定

次に、サルモネラの GGT 活性について解析を行った。大腸菌では低温環境下 (20 °C 付近) で、その GGT 活性が大腸菌の至適培養温度である 37 °C よりも著しく上昇することが報告されている。そこで、サルモネラの GGT 活性の至適条件の検討を行ったところ、サルモネラでも大腸菌と同様に低温環境下 (20 °C) での培養が 37 °C での培養時よりも著しく GGT 活性が上昇することが認められた。また、この現象がサルモネラに一般的に認められるのかを確認するために、由来の異なるサルモネラ (*S. Typhimurium* 計 2 株と *S. Enteritidis* 計 3 株) についても GGT 活性を測定した。その結果、一部の菌株では低温での培養で活性が著しく上昇することは認められたが、他方では温度に関わらずに GGT 活性が変化しない菌株も認められた。また、GGT 活性は菌株間で大きく異なることが認められた。これらより、サルモネラにおける GGT はその血清型ではなく、各菌株間において GGT 産生能に大きな違いがあることが推測された。

(3)GGT の発現に関与する因子の検索と分子機構の解析

サルモネラにおける GGT 発現に関する因子や分子メカニズムについては不明であった。そこで、はじめに GGT の発現を制御する因子の同定を行うことを試みた。サルモネラ GGT は低温環境下での培養でその活性化が著しく上昇する。このことから、低温環境下

で遺伝子発現制御に関与する Hns と Hfq の 2 つの因子に焦点を絞り解析を行った。

はじめに、それぞれの遺伝子を相同組換え法により破壊した遺伝子欠損株の作製を試み、*hfq* 遺伝子欠損サルモネラ (Δhfq) を作製することはできたが、残念ながら *hns* 遺伝子を標的とした変異株を作製することが出来なかった。これは、*hns* 遺伝子がサルモネラの生命活動には必須であることが原因であると思われる。

次に Δhfq を用いて GGT 活性測定を行ったところ、野生株と比較して Δhfq では著しい GGT 活性の低下が認められた。また、*hfq* 遺伝子を Δhfq に相補した菌株では、 Δhfq と比較して有意な GGT 活性の上昇が認められた (図 1)。このことより、サルモネラにおける GGT 発現には Hfq が深く関与することが明らかとなった。さらに、Hfq は RNA chaperone として non-coding small RNA (sRNA) の機能発現に重要な役割を担っており、そのためサルモネラにおける GGT 発現にも sRNA の関与が推測された。そこで、温度感受性の性質を持つことが報告されている *dsrA* の欠損させた変異株を作製し、GGT 活性測定を行った。その結果、野生株と比較して有意に GGT 活性は減少するが、 Δhfq よりも有意に GGT 活性が高いことがわかった (図 1)。以上の結果より、サルモネラの GGT 発現には Hfq が重要な役割を担っており、*dsrA* を含めた複数の因子が介在する可能性が推測された。今後は、より詳細な GGT の発現に対する分子メカニズムを明らかにする予定である。

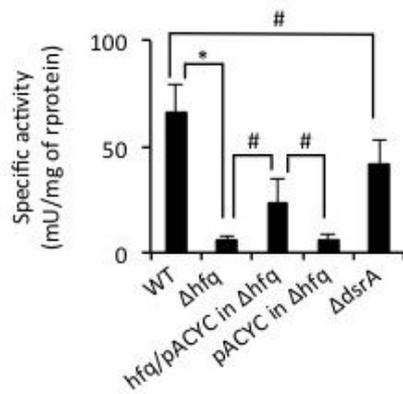


図 1. GGT 活性測定 (20 °C)

WT: 野生型サルモネラ、Δhfq: hfq 遺伝子欠損株、hfq/pACYC in Δhfq: hfq 遺伝子を相補したΔhfq、pACYC in Δhfq: 空ベクターを相補したΔhfq、ΔdsrA: dsrA 遺伝子欠損株。
*, p < 0.01、#, p < 0.05。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

1. Akazawa Y, Isomoto H, Matsushima K, Kanda T, Minami H, Yamaguchi N, Taura N, Shiozawa K, Ohnita K, Takeshima F, Nakano M, Moss J, Hirayama T, Nakao K.: Endoplasmic reticulum stress contributes to *Helicobacter pylori* VacA-induced apoptosis. PLoS One 8: e82322, 2013. 査読有、DOI: 10.1371/journal.pone.0082322.
2. 中野政之、八尋錦之助、平山壽哉：*Helicobacter pylori* の病原因子。「臨床と微生物」, vol. 40, No. 2, p. 178-181, 2013. 査読なし
3. 中野政之、平山壽哉：ピロリ菌の空胞化毒素 VacA の病原性に関する新たな洞察。「日本ヘリコバクター学会誌」, vol. 15, p. 12-21, 2013. 査読なし
4. 平山壽哉、中野政之：ピロリ菌感染における vacuolating cytotoxin (VacA) の役割に

関する研究。「化学療法の領域」, vol. 29 (12), p. 117-123, 2013. 査読なし

5. Nakano M, Yamasaki E, Ichinose A, Shimohata T, Takahashi A, Akada JK, Nakamura K, Moss J, Hirayama T, Kurazono H.: *Salmonella* enterotoxin (Stn) regulates membrane composition and integrity. Dis Model Mech. 5: 515-521, 2012. 査読有、DOI: 10.1242/dmm.009324
 6. Romeo A, Sonnleitner E, Sorger-Domenigg T, Nakano M, Eisenhaber B, Bläsi U.: Transcriptional regulation of nitrate assimilation in *Pseudomonas aeruginosa* occurs via transcriptional antitermination within the nirBD-PA1779-cobA. Microbiology 158: 1543-1552, 2012. 査読有、DOI: 10.1099/mic.0.053850-0
 7. Yahiro K, Satoh M, Nakano M, Hisatsune J, Isomoto H, Sap J, Suzuki H, Nomura F, Noda M, Moss J, Hirayama T.: Low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP1) mediates autophagy and apoptosis caused by *Helicobacter pylori* VacA. J Biol Chem. 287: 31104-15, 2012. 査読有、DOI: 10.1074/jbc.M112.387498
- [学会発表](計14件)
1. 中野政之、八尋錦之助、久恒順三、赤田純子、野田公俊、平山壽哉：*Helicobacter pylori* VacA induces activation of c-Src signaling pathway through RPTPα. 第87回日本細菌学会総会。東京都。2014年3月26日-28日
 2. Hirayama T, Nakano M, Noda M, Yahiro K: LRP-1 mediates autophagy and apoptosis caused by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin, VacA. XXVIth

- International Workshop on *Helicobacter* and related bacteria in chronic digestive inflammation and gastric cancer. Madrid, Spain. 2013年9月12日-14日
3. Nakashima S, Kakugawa T, Harada T, Hara S, Sakamoto N, Nakano M, Ishimatsu Y, Isomoto H, Mukae H, Kurazono H, Hirayama T, Kohno S: Identification of *Helicobacter pylori* VacA in human lung and its effects on airway epithelial cells. ERS Annual Congress 2013. Barcelona, Spain. 2013年9月7日-11日
4. Hirayama T, Yahiro K, Nakano M, Noda M, Moss J: Low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) mediates autophagy and apoptosis caused by *Helicobacter pylori* VacA. 15th International Congress of Immunology. Milan, Italy. 2013年8月22日-27日
5. 八尋錦之助、中野政之、野田公俊、平山壽哉：ピロリ菌の空胞化毒素 VacA によるオートファジーとアポトーシスは LRP1 を介して誘導する。第 19 回日本ヘリコバクター学会学術集会。長崎市。2013年6月28日-29日
6. 八尋錦之助、中野政之、野田公俊、平山壽哉：ヘリコバクター・ピロリ VacA の LRP1 を介したオートファジーとアポトーシス誘導。第 86 回日本細菌学会総会。千葉市。2013年3月18日-20日
7. Hirayama T, Nakano M: Low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) mediates autophagy and apoptosis caused by *Helicobacter pylori* VacA. The 6th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases & The 11th Nagasaki-Singapore Medical Symposium. 長崎市。2012年12月10日-12日
8. Nakano M and Hirayama T: *Salmonella* Stn regulates membrane composition and integrity. The 6th Nagasaki Symposium on Tropical and Emerging Infectious Diseases & The 11th Nagasaki-Singapore Medical Symposium. 長崎市。2012年12月10日-12日
9. Yahiro K, Nakano M, Noda M, Sap J, Moss J, Hirayama T: Low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) mediates autophagy and apoptosis caused by *Helicobacter pylori* VacA. The 4th EMBO Meeting. Nice, France. 2012年9月22日-25日
10. Nakano M, Yamasaki E, Shimohata T, Takahashi A, Kurazono H, Hirayama T: Evaluation of the function of Stn produced by *Salmonella*. The 11th Awaji International Forum on Infection and Immunity. 淡路市。2012年9月11日-14日
11. Hirayama T, Nakano M: *Salmonella* Stn regulates membrane composition and integrity. 14th International Symposium on Microbial Ecology. Copenhagen, Denmark. 2012年8月19日-24日
12. Nakano M, Yamasaki E, Shimohata T, Takahashi A, Moss J, Kurazono H, Hirayama T: A new insight into the function of Stn produced by *Salmonella*. American Society for Microbiology 112th General Meeting. San Francisco. 2012年6月16日-19日
13. 平山壽哉、中野政之：ヘリコバクター・ピロリ VacA 毒素は多様な経路でミトコンドリア障害によるアポトーシスを引き起こす。第 85 回日本細菌学会総会。長崎市。

2012年3月27日-29日

14. 中野政之、山崎栄樹、赤田純子、中村和行、平山壽哉、倉園久生：サルモネラエンテロトキシン（Stn）の新規機能解析。第85回日本細菌学会総会。長崎市。2012年3月27日-29日。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野 政之（NAKANO, Masayuki）

長崎大学・熱帯医学研究所・助教

研究者番号：60398005